

Vergleichende biochemische
und immunologische Studien an
Proteinextrakten normaler und maligne
entarteter Gewebe

Untersuchungen
eines normalen Magenschleimhautextraktes
und des Homogenats eines Magencarcinoms

von

Renate Funke
aus Bochum

1965

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK DER FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN - NÜRNBERG

Direktor: Professor Dr. med. N. Henning

VERGLEICHENDE BIOCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE STUDIEN AN
PROTEINEXTRAKTEN NORMALER UND MALIGN ENTARTETER GEWEBE

Untersuchungen eines normalen Magenschleimhautextraktes
und des Homogenats eines Magencarcinoms

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT

zu

ERLANGEN - NÜRNBERG

vorgelegt von
Renate Funke
aus Bochum

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. Dr. G. Steinhardt
Referent: Professor Dr. med. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 1965

In einer größeren Untersuchungsserie an Organextrakten maligne entarteter und histologisch intakter Gewebe wird auf Grund vergleichender Studien an den elektrophoretisch differenzierbaren und färbereich sowie durch Fermentreaktionen charakterisierbaren Proteinkomponenten ebenso wie mit immunologischen Methoden geprüft, ob Unterschiedlichkeiten derartiger Gewebshomogenate in quantitativer und qualitativer Hinsicht bestehen (23, 24). Die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag darstellen zur Klärung der Frage nach einem proteingebundenen Faktor, der, entweder an eine bestimmte Fraktion gekoppelt oder durch spezifische Antigenität charakterisierbar, ubiquitär in allen malignen Geweben nachgewiesen werden und somit diagnostisch verwertbar sein kann.

I. UNTERSUCHUNGSGUT, VERSUCHSANORDNUNG UND METHODE

1. UNTERSUCHUNGSGUT

Untersucht wurden der Extrakt des Operationspräparates eines frisch resezierten, histologisch gesicherten Adenocarcinoms des Magens und, als Vergleichsobjekt, das homogenisierte Substrat eines analogen, operativ entnommenen Magenpräparates, das histologisch unverändert war⁺). Die Organe kamen unmittelbar nach Operation zur Verarbeitung.

⁺)

Die Operationspräparate verdanken wir der Chirurg. Univ. Klinik Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. G. Hegemann), deren histologische Beurteilung dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. E. Müller).

2. VERSUCHSANORDNUNG

Die Extrakte wurden agarelektrophoretisch aufgetrennt, die einzelnen Komponenten färbetrisch und durch Fermentreaktionen sowie immunologisch charakterisiert. Die immunologische Differenzierung erfolgte durch die zweidimensionale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY und durch die Immunoelktrophorese nach GRABAR und WILLIAMS. Hierbei wurden ein Antihumanserum sowie die jeweils selbst hergestellten spezifischen Anti-Extraktseren verwendet.

3. METHODIK

a) Aufbereitung der Organe (3, 6)

Von den Organen wurden Fettsubstanz und Bindegewebe weitgehend abpräpariert. Das Gewebe wurde danach grob zerkleinert und zur Entblutung 3 Std in einem geschlossenen System gewässert. Anschließend wurden die Gewebestückchen im Multimix zertrümmert und weiterhin im Ultra-Turrax, nach Mischung mit physiol NaCl im Verhältnis 1 : 4, homogenisiert, schließlich 20 min bei 12000 U/min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und gegen 20%iges Kollidon in Dialysierschläuchen 24 Std bei +4°C auf eine 4%ige Eiweißlösung eingeengt.

b) Kombinierte agarelektrophoretische und biochemische Methoden

Zur Agarelektrophorese (4, 8, 9a-b, 10a-b): Glasplatten mit den Abmessungen 4 x 10 cm wurden mit je 8 ml des verflüssigten Elektrophoreseagars beschickt und zum Erstarren gebracht. In der Mitte dieser Plättchen wurden 2 Auftragstellen von je 10 x 2 mm ausgestanzt. Diese Auftragstellen wurden mit einem Gemisch der jeweiligen Extrakte mit Elektrophoreseagar im Verhältnis 1 : 2 bis zum Rand gefüllt und mit blankem Elektrophoreseagar überschichtet.

Zwischen beide Proben wurde vielfach zum Vergleich punktförmig ($\phi = 2 \text{ mm}$) ein menschliches Serum mit angesetzt. Die Dauer der Elektrophorese betrug bei 6 Loppelsätzen 90 min bei einer angelegten Gleichspannung von 90 V. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Platten für die Protein-, Glyko- und Lipoproteid-Färbung in 2%ige Essigsäure gelegt, während die Platten für die weiteren Farb- und Fermentreaktionen unverzüglich mit den entsprechenden Inkubationslösungen behandelt wurden.

Zur Anwendung gelangten:

1. Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B (4, 9a-b, 28b, 30)
2. Glykoproteidfärbung mit SCHIFF'schem Reagens (9a-b, 29)
3. Lipoproteidfärbung mit Sudanschwarz B (4, 9a-b, 28d)
4. Fermentreaktionen zum Nachweis von Esterasen durch die Ester des Indoxyl und B-Naphthyl (9a-b, 21)
5. Fermentreaktion der Lactatdehydrogenase (LDH) (31)
6. Fermentreaktion zum Nachweis amylaseaktiver Komponenten (19, 22)
7. Fermentreaktion zum Nachweis der Peroxydase (9a-b)
8. Fermentreaktion zum Nachweis der alkalischen Phosphatase (25)
9. Fermentreaktion zum Nachweis der Oxydase (9a-b, 20, 28a, 28c)

c) Immunologische Methoden

a) Zweidimensionale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (14, 27)

Diagläschen mit den Abmessungen 5 x 5 cm wurden mit 3 ml Elektrophoreseagars beschickt und zum Erstarren gebracht. Aus der Agarschicht wurden im Abstand (Mittelpunkt zu Mittelpunkt) von 1,5 cm in quadratischer Anordnung 4 Löcher ($\phi = 6 \text{ mm}$) ausgestanzt und mit den Organextrakten bzw den spezifischen Antiseren bis zum Rande gefüllt. Die Versuchsanordnung wurde

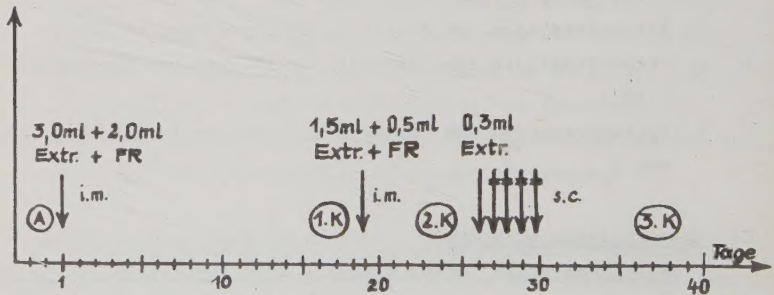
so gewählt, daß je ein Antigen-Antikörper-System des Normal-extraktes und des Carcinomextraktes einander gegenübergestellt wurden.

c) Immunoelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (4, 8, 9a-b, 10a-b)

Die Magenschleimhautextrakte wurden immunoelektrophoretisch analysiert, u. zw. jeweils gegen Antihumanserum, Anti-Magen-normalserum und Anti-Magencarcinomserum. Schließlich wurden die verschiedenen Antiseren mit den konträren Extrakten versetzt und somit bereinigt.

d) Herstellung der Organ-Antiseren

Sie erfolgte durch Sensibilisierung von je einem Kaninchen mit den Organextrakten nach folgendem Injektionsschema:



(A) = Ausgangswert

(K) = Kontrolluntersuchung

Extr. = Organextrakt

FR = FREUNDsches Adjuvans

II. ERGEBNISSE

1. ELEKTROPHORETISCHE ERGEBNISSE UND FERMENTREAKTIONEN

Mit Amidoschwarz 10 B konnten im Extrakt der maligne entarteter Magenschleimhaut insgesamt bis zu 8 Komponenten differenziert werden; unter ihnen waren 2 Komplexe, der eine im α -, der andere im γ -Globulinbereich, die jeweils mindestens 2 Fraktionen erkennen ließen. Besonders deutlich anfärbbar traten eine Fraktion mit der Wanderungsgeschwindigkeit des Albumins (Vergleich mit menschlichem Serum). Abwegig vom normalen Serum fielen, weit vor dem Albumin gewandert, zwei schmale, eng aneinanderliegende und nur schwach gefärbte Fraktionen auf. Außerdem konnte eine verwaschene Farbzone unmittelbar vor dem Albumin nachgewiesen werden. (Abb. 1a)

Im Extrakt der normalen Schleimhaut waren ebenfalls bis zu 8 Proteinfraktionen zu differenzieren. Besonders in Erscheinung trat die dem Albumin vergleichbare Fraktion sowie eine weit anodisch gewanderte Doppelfraktion, von welcher die schnellere Komponente intensiver angefärbt war, als ihr benachbartes Protein. Alle anderen Eiweißsysteme waren weniger gut darstellbar. (Abb. 1b)

Mit SCHIFF'schem Reagens ließ sich im Tumorextrakt im Bereich der Albumine bzw der schnell wandernden α_1 -Globuline eine schwache Färbung erkennen. An der Auftragestelle zeigte sich eine deutliche Reaktion und in einer Zone kathodisch von der Auftragestelle, etwa bis in die Gruppe der β_2 -Globuline reichend fand sich eine relativ deutliche Farbreaktion. (Abb. 2a)

Im Normalextrakt war eine Fraktion an der Stelle der Albumine bzw der schnell wandernden α_1 -Globuline angefärbt. Eine schlierenhafte Farbtönung fand sich im Bereich der α -Globuline bis an die Auftra-

gestelle, die Auftragestelle selbst ist ebenfalls gefärbt. Das vergleichsweise mitanalysierte Serum zeigte praktisch im Bereich aller Fraktionen eine positive Färbung, am stärksten jedoch typischerweise im γ_2 -Bereich. (Abb. 2b)

Mit Sudanschwarz trat im Carcinomextrakt eine stark gefärbte, breite Zone von der Auftragestelle bis in den Bereich der β -Globuline in Erscheinung, eine Differenzierung von Unterkomponenten ist nicht sicher möglich. Darüberhinaus zeigte sich eine schwache Farbreaktion im Bereich der α_2 -Globuline. In 2 Ansätzen konnte darüberhinaus im Bereich der Albumin/ α_1 Globulinfraktion ein schwach gefärbter Komplex mit Differenzierung in 2 Komponenten, ferner vor diesen wandernd, ebenfalls eine Farbzone mit Doppelung und vor dieser schließlich eine weitere Fraktion, die allerdings sehr schmalbasig in Erscheinung trat. (Abb. 3a)

Im Extrakt der normalen Schleimhaut konnte regelmäßig eine breite Zone, die sich von der Auftragestelle über den β_1 -Bereich bis in die Gruppe der β_2 -Globuline erstreckte, festgestellt werden. In 2 weiteren Analysen zeigten sich auch hier Färbungen im anodischen Bereich und zwar in Gestalt einer schmalen Bande unmittelbar vor den Albuminen und mit einer ebenfalls schmalen Fraktion weit vor dieser. (Abb. 3b)

Die Auftragestelle war in beiden Fällen stark angefärbt.

Die mit Indoxylacetat nachweisbare Esteraseaktivität in den getrennten Fraktionen war im Fumorextrakt ausschließlich auf eine verhältnismäßig breite Zone im γ -Globulinbereich beschränkt, sie ließ eine Unterteilung in 2 Fraktionen erkennen. (Abb. 4a)

Im Normalschleimhautextrakt waren an gleicher Stelle, darüberhinaus auch im anodischen Bereich, der Zone der α_2 -Globuline entsprechend,

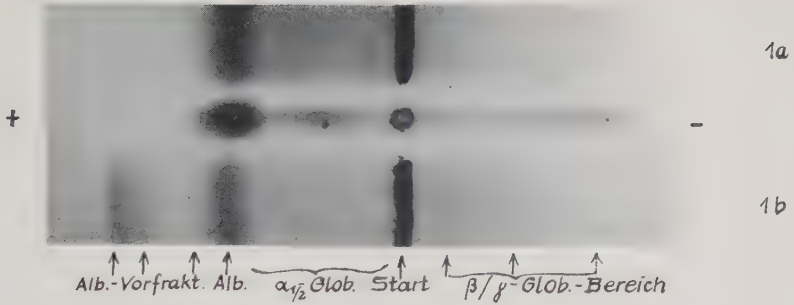


Abb.1: Agarelektrophorese der Extrakte eines Magencarcinoms (1a) sowie der normalen Magenschleimhaut (1b) nach Proteinfärbung nach Amidoschwarz 10B. Zwischen beiden das punktförmig mitangesetzte menschliche Serum.

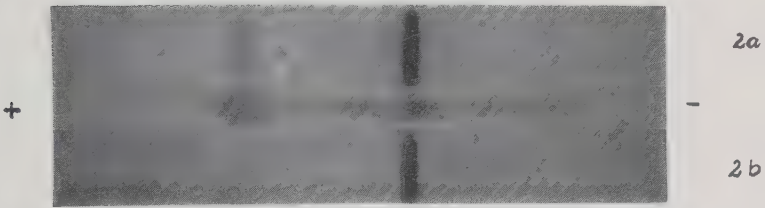


Abb.2: Agarelektrophoretische Analyse der gleichen Organpaare mit anschließender Färbung mit Schiff'schem Reagenz. 2a Tumorextrakt, 2b Normalextrakt.

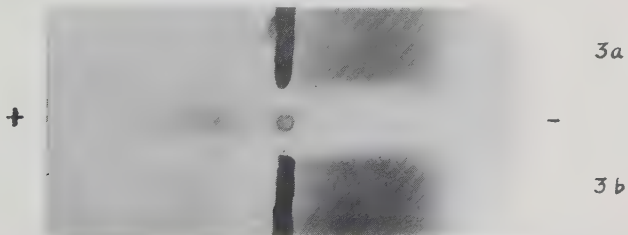


Abb.3: Lipoproteidfärbung der agarelektrophoretisch getrennten Extrakte eines Magencarcinoms (3a) und der normalen Magenschleimhaut (3b).

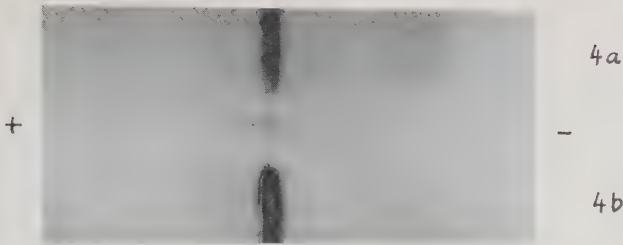


Abb.4: Esteraseaktivität der agarelektrophoretisch getrennten Organextrakte nach Färbung mit Indoxylacetat.
4a Magentumor, 4b Magenschleimhaut.

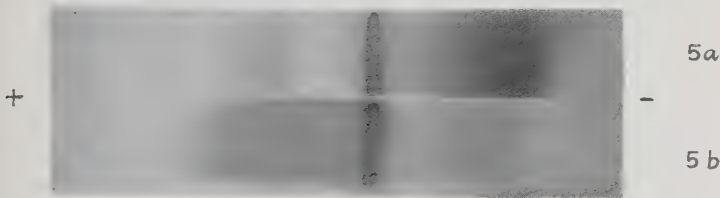


Abb.5: Nachweis esteraseaktiver Komponenten mit Hilfe des β -Naphthylacetats in den agarelektrophoretisch getrennten Extrakten eines Magencarcinoms (5a) und der normalen Magenschleimhaut (5b).

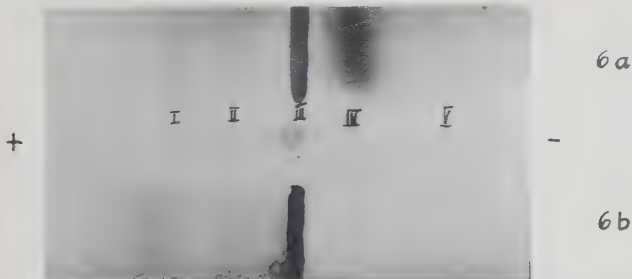


Abb.6: Agarelektrophorese der Extrakte eines Magencarcinoms (6a) sowie der normalen Magenschleimhaut (6b) mit anschließender Darstellung der LDH-Aktivität.

und schwach schließlich auch eine Gruppe von β -Globulinen gebunden, Farbreaktionen wahrnehmbar. (Abb. 4b)

Die Startstellen waren bei beiden Extrakten blau getönt.

Bei Anwendung von β -Naphthylacetat ließen sich im Tumorextrakt sowohl im anodischen wie auch im kathodischen Bereich einwandfrei Farbreaktionen nachweisen. Unter ihnen imponierte gemessen an der Intensität, ein Komplex im Bereich der γ -Globuline, der möglicherweise in 2 Komponenten zu unterteilen ist. Eine Farbschliere zog sich von diesem bis an die Auftragestelle. Außerdem zeigte sich eine Farbzone im Bereich der Albumin/ α_1 -Globuline, die ihrerseits ebenfalls in 2 Komponenten zu differenziert zu sein schien. Besonders auffallend war schließlich auch eine schmale, weit anodisch gewanderte Komponente. Demgegenüber zeigte sich im Normalschleimhautextrakt eine breite Zone von der Auftragestelle bis in die Albuminvorfraction, die 2 Komponenten erkennen ließ. An Stelle der γ -Globuline bzw der langsamer wandernden β_2 -Fraktion war ein einzelner Komplex angefärbt. (Abb. 5a,b)

Die Farbreaktionen zum Nachweis der LPH ließ im Tumorextrakt 3 sichere fermentaktive Komponenten erkennen, die eine an Stelle der LPH_1 , die zweite an Stelle der LPH_4 , die besonders durch ihre Farbintensität ausgezeichnet war, und die dritte an Stelle der LPH_5 , darüberhinaus war im Bereich der α_2 -Globuline (LPH_2) und außerdem noch in einem Bereich vor der LPH_1 je eine Farbzone erkennbar. (Abb. 6a)

Im Extrakt der normalen Magenschleimhaut ließ sich nur eine Komponente sicher nachweisen, außerdem ließ sich an Stelle der LPH_2 eine Farbzone und darüberhinaus ein ähnliches Phänomen wie im Tumorextrakt vor der LPH_1 aufzeigen. (Abb. 6b)

An den Auftragestellen zeigte sich in allen Fällen eine deutliche Farbreaktion.

Mit Benzidin ließen sich im Tumorextrakt 2 Fraktionen färberisch sichtbar machen, die eine in Albuminbereich, die andere unmittelbar anodisch von der Auftragestelle. Der vergleichsweise mitangesezte Normalextrakt zeigte ebenfalls im Bereich der Albumine und außerdem an der Auftragestelle eine Blaufärbung. Die zuletzt genannte Fraktion unterschied sich von der im Tumorextrakt beschriebenen 2. Fraktion durch ihre geringe Wanderungsgeschwindigkeit.

Oxydase war weder im Tumorextrakt noch im Normalextrakt in dieser Versuchsanordnung darstellbar.

Alkalische Phosphatase ließ sich im Tumor praktisch nicht nachweisen. Es war lediglich die Auftragestelle schwach gefärbt.

Im Normalschleimhautextrakt konnte dagegen eine intensive Farbreaktion in einem Bereich unmittelbar anodisch von der Auftragestelle (α_2 -Bereich), wie auch am Start selbst, nachgewiesen werden.

Amylaseaktivität war in Tumor auf Grund einer relativ deutlichen und scharf umschriebenen Aufhellungszone im Bereich der γ_1 -Globulinfraktion bzw der β_2 -Globuline nachzuweisen. Außerdem zeigte sich ein rosa gefärbter Bezirk anodisch von der Auftragestelle bis in die Gruppe der α_1 -Globuline und schließlich eine violett gefärbte Fraktion an der Stelle der Albumine.

Im Normalschleimhautextrakt stellten sich im γ -Globulinbereich 2 relativ deutlich abgrenzbare Bezirke des Stärkeabbaus dar, außerdem eine rosa gefärbte Zone anodisch von der Auftragestelle bis in den Albuminbereich sowie schließlich eine dunkler rot-violett gefärbte Fraktion an der Stelle der Albumine dar.

2. IMMUNOLOGISCHE ERGEBNISSE

a) Zweidimensionale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY

Unter Verwendung von Kaninchenserum mit optimaler Präcipitinkonzentrationen gegen normale Magenschleimhaut sowie gegen den Extrakt eines Magencarcinoms, konnten sowohl gegen das spezifische Antigen als auch gegen das konträre Antigen mehrere, bis zu 7 Präcipitationssysteme nachgewiesen werden. Ein Teil der spezifischen Präcipitationslinien zwischen normaler Magenschleimhaut und Antischleimhautserum zeigten bei Vergleich mit den spezifischen Tumor-Antitumor-Präcipitaten nur für 3 Systeme Identität, für weitere 2 Linien Teilidentität und in 2 Fällen Kreuzreaktionen.

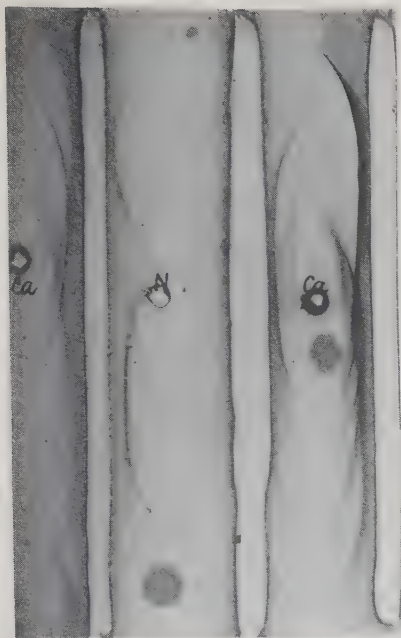
b) Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS

Die normale Magenschleimhaut zeigte gegen das spezifische Antiserum eine Komponente weit im anodischen Bereich und dicht am Antiserumkanal gelegen eine schwache Präcipitationslinie unmittelbar anodisch vor der Auftragestelle sowie 2 in weitem Bogen verlaufene Linien mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit von der Auftragestelle bis in die Zone der γ_1 -Globuline reichend. Gegen das Anti-Carcinomserum war lediglich eine schwache Präcipitationslinie nachzuweisen, die sich ganz in der Nähe des Antiserumkanals von der Auftragestelle in flachem Bogen bis in die Gruppe der γ_1 -Globuline erstreckte. Eine zweite schwache Präcipitationslinie zeigte sich im Gebiet um die Auftragestelle. Gegen das Anti-Humanserum konnte ein verwaschener Präcipitationsbogen im anodischen Bereich (schnell wandernde α_1 -Globuline/Albumine), ein ebensolcher, kürzer bogig um die Auftragestelle sowie 2 verhältnismäßig langgestreckte, sich schneidende Linien von der Auftragestelle bis in die Gruppe der γ_1 -Globuline nachgewiesen werden. Der Carcinomextrakt zeigte gegen sein spezifisches Antiserum 5 deutlich abgrenzbare Präcipitationslinien, von welchen eine als besonders

langgestreckte und gedoppelte Linie vom γ_1 -Bereich bis in die Gruppe der β_1 -Globuline auffiel. Von der übrigen ist eine von der Auftragestelle bis in die Zone der langsam wandernden α_1 -Globuline reichende zu innerst gelegene Linie zu erwähnen, die einer Lipidfraktion entsprechen dürfte, ferner waren 2 Fraktionen vorwiegend im kathodischen Bereich nachweisbar. Gegen das Antischleimhautserum entwickelte der Carcinomextrakt ebenso wie gegen das Anti-Humanserum eine weitaus größere Anzahl von Präcipitationslinien, die sich vom Muster der spezifischen Anticarcinompräcipitate in vielen Einzelheiten unterschieden. Hierbei fiel vor allem mit dem Anti-Humanserum eine weit gewanderte Fraktion auf, die die Position eines physiologischen Globulins im Serum in Richtung der Kathode überschritt, eine genaue Zuordnung dieser Fraktion ist nicht möglich. (Abb. 7)

Nach Absorption der verschiedenen Antiseren durch die konträren Antigenextrakte, konnte gegen den getrennten normalen Schleimhautextrakt weder mit dem bereinigten Anti-Carcinomserum noch mit dem bereinigten Anti-Schleimhautserum ein Präcipitat nachgewiesen werden. Gegen Carcinomextrakt war mit dem bereinigten Antinormalserum keine Präcipitationslinie nachweisbar, dagegen ließen sich gegen das bereinigte Anti-Carcinomserum 5 schwache Linien zeigen, unter ihnen 2 Komponenten im anodischen Bereich unmittelbar von der Auftragestelle ausgehend bis in die Gruppe der α_1 -Globuline reichend. (Abb. 8)

+



A-N - A-Ca AHS

Abb.7: Immunelektrophorese der Organextrakte mit den spezifischen Antiseren und Antihumanserum.

Abb.8: Immunelektrophorese der Organextrakte mit den spezifischen Antiseren, den bereinigten Extrakten und Antihumanserum.

+



A-N A-Ca A-N absorb. - A-Ca absorb. AHS

7

8

III. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen zunächst, daß die hier verglichenen Proteinextrakte einer histologisch normalen Magenschleimhaut und eines Magencarcinoms in der Qualität ihrer elektrophoretisch differenzierbaren Eiweißsysteme, sowie in ihren immunologischen Eigenschaften gewisse Unterschiedlichkeiten aufweisen. Diese kommen sowohl in ihrer mit Amidoschwarz 10 B darstellbaren Verteilung der einzelnen Gewebseiweißkörper zum Ausdruck, als in den biochemischen Eigenschaften dieser Proteine.

Der Befund eines agarelektrophoretisch getrennten und anschließend mit Amidoschwarz 10 B gefärbten Magenschleimhautextraktes entspricht früheren eigenen (5, 17), sowie inzwischen in der Literatur bekannt gewordenen Ergebnissen. Der hier mituntersuchte Carcinomextrakt zeigt insofern eine Abweichung von dem normalen Schleimhautgewebe, als die weit im anodischen Bereich gelegene Vorfraction gegenüber dem Normalextrakt wesentlich schwächer nachweisbar ist. Das Carcinomgewebe weist demgegenüber offensichtlich eine Anreicherung an $\hbar$ -Globulinen auf. Diese Anreicherung an $\hbar_2$ -Komplexen scheint, wie dies durch die Kil-Färbung bestätigt wird, vorwiegend durch Glycoproteide bedingt zu sein. Dies deckt sich im übrigen mit den Befunden eines in gleicher Weise untersuchten Carcinomgewebes der Colonschleimhaut (24). Es wurde bereits im dortigen Zusammenhang auf genetische Beziehungen zwischen dem Proteinmuster des Carcinoms und der Dysproteinämie vom $\hbar$ -Typ des Carcinomträgers hingewiesen.

Unterschiede ergeben sich weiter bei Untersuchung der beiden Extrakte auf ihren Gehalt und das Verteilungsmuster ihrer esteraseaktiven Komponenten. Wie mit Indoxylacetat darstellbaren spezifischen Esterasen, - mit hoher Wahrscheinlichkeit Acetylcholinesterasen, - unterscheiden sich darin, daß im Tumorextrakt die Komponente des $\hbar_2$ -Bereiches fehlt

und daß auch die mit β -Naphthylacetat darstellbaren, fermentaktiven Komponenten qualitative Differenzen aufweisen. Während im Normalextrakt ein in etwa 2 Komponenten unterteilbarer, deutlich gefärbter bis in die Zone der Präalbumine verlaufener Farbkomplex und im γ -Bereich eine im Verhältnis dazu weniger gut angefärbte Aktivitätszone in Erscheinung tritt, fällt im Tumorextrakt insbesondere Farbreaktionen an der Stelle der γ -Globuline, weniger stark, aber verhältnis umschrieben auch im Bereich der anodisch gewanderten β_1 -Globuline bzw der Albumine und schließlich eine schmale Fraktion weiter vor den Albuminen auf.

Auch hier findet sich Übereinstimmung mit früheren Untersuchungsergebnissen von normaler Colonschleimhaut und von Colocarcinomextrakt insofern, als das Carcinomgewebe eine relative Anreicherung und eine deutliche qualitative Abweichung der esteraseaktiven Komponenten gegenüber dem normalen Schleimhautextrakt zeigt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit älteren Untersuchungen über die Esteraseaktivität in maligne entarteten Geweben (2, 7), so finden sich lediglich Parallelen zu den hier vorliegenden Befunden mit Indoylacetat, d.h. auch hier erscheinen die Acetylcholinesterasen im Tumorgewebe insgesamt reduziert zu sein.

Die mit β -Naphthylacetat nachweisbaren Esterasen, - bei denen es sich wahrscheinlich um Ali-Esterasen handelt, - sind im Tumorextrakt hier dagegen einwandfrei vermehrt.

Die Ergebnisse der LPH-Färbung zeigen eine qualitative und quantitative Anreicherung von Fraktionen im Tumorextrakt gegenüber dem Normalgewebe. Dabei imponiert insbesondere die Fraktion IV, d.h. eine der kathodisch gewanderten Komponenten. Diese Feststellung entspricht Befunden anderer Autoren (1, 16, 18).

Sie bekräftigt im gewissen Umfang zugleich die Hypothese, daß im Tumorgewebe die LPH-Aktivität vermehrt ist bzw, daß bei Gewebeerfall oder

Erhöhung der Zellpermeabilität maligner Tumoren eine Freisetzung der LDH in die Blutbahn ermöglicht wird, was bekanntlich auch diagnostisch verwertbar ist. Untersuchungsergebnisse an der normalen und maligne entarteten Colonschleimhaut (24), sowie kürzlich abgeschlossene Studien an primärem Leberzellcarcinom im Vergleich zu normalem Leberparenchym (23), haben derartige Befunde jedoch nicht ergeben. Auch klinisch findet man nicht generell bei Malignomen, selbst nicht bei generalisiert wachsenden oder zerfallenden Tumoren, gleichzeitig einen Anstieg der LDH. Dieser Fermentindikator ist also nicht schlechthin als Malignitätskriterium zu werten, er stellt offenbar einen Faktor dar, der an eine noch zu definierende Proteingruppe gebunden sein dürfte. Diese scheint ubiquitär in verschiedenen Gewebearten vorzukommen. Dabei dürfte der Fraktion IV in einzelnen Malignomen eine besondere Rolle zukommen.

Die Diskrepanz der Befunde bei Prüfung auf alkalische Phosphatase, - deutliche Anreicherung im normalen Schleimhautextrakt, praktisch keine Aktivität im Tumorextrakt, - überrascht insofern, als man im Tumorextrakt eher eine Anreicherung erwartet hätte. Das könnte dafür sprechen, daß in malignen Zellen die aktiv gebildete alkalische Phosphatase nicht gespeichert, sondern unmittelbar nach Entstehung an die Umgebung abgegeben wird. Es ist wenig wahrscheinlich, daß die maligne entartete Zelle zu keiner entsprechenden Fermentbildung fähig sei, da Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der alkalischen Phosphatase und dem Wachstum von Carcinomzellen (11) dazu geführt haben, daß die Aktivität der alkalischen Phosphatase vom Wachstum solcher Zellen abhängig ist.

Alle übrigen Fermentreaktionen zeigten keine nennenswerten Unterschiede in den miteinander verglichenen Extrakten.

Auf Grund der immunologischen Ergebnisse darf festgestellt werden, daß

beiden Extrakten, wenigstens bei einer Teil ihrer Proteine, unterschiedliche Antigenität zukommt. Offenbar unterscheiden sich die Tumorseproteine immunologisch wenigstens in 2 Systemen von den Antigenen des Normalextraktes. Wie die Immunelektrophorese zeigt, handelt es sich dabei um Proteine vom Typ der α -Globuline. Für die immunologische Besonderheit des Tumorgewebes gegenüber dem normalen Schleimhautextrakt spricht u.a. auch die Tatsache, daß die für die Immunserumgewinnung sensibilisierten Tiere sich in ihrer Antikörperbildung verschieden verhalten haben, d.h. eine quantitativ intensivere und qualitativ unterschiedliche Antikörperbildung gegenüber den mit normalem Schleimhautextrakt behandelten Tieren zeigten. Diese im übrigen auch in der Literatur mitgeteilte Beobachtung (23, 24) wird möglicherweise durch die im Tumorextrakt angereicherten Glycoproteinstrukturen des α -Globulinbereiches, die nach Angaben der älteren Literatur (12, 13, 15, 26) die Antigenität eines Proteins erhöhen, bzw dessen Antikörperbildung aktivieren sollen, mitverursacht. Aus dieser Tatsache ist abzuleiten, daß Tumorseproteine auch im Trägerorganismus Antigenität entfalten, die auf Grund der klassischen Immunitätslehre zwangsläufig zu einer spezifischen Antikörperbildung führen können. Die Konsequenz für klinische Fragen besteht infolgedessen darin, daß unter der Voraussetzung der Existenz solcher zirkulierender Tumorentikörper diagnostische Möglichkeiten gegeben sind. Zweifellos handelt es sich dabei nur um einen serologischen Indikatorfaktor. Zu klären wäre in diesem Zusammenhang die Frage seiner Spezifität und die Frage des Zeitpunktes seines Auftretens, eine Problemstellung, die ausschließlich dem Tierexperiment vorbehalten bleibt.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurden die Extrakte eines Magencarcinoms sowie einer normalen Magenschleimhaut dahingehend verglichen, ob die in einem elektrischen Feld getrennten Komponenten in ihrer elektrophoretischen Mobilität, ihren biochemischen, d.h. durch Farb- und Fermentreaktionen charakterisierbare Eigenschaften, sowie deren Antigenität, Unterschiede aufweisen. Dabei sollte vor allem ein Beitrag zur Frage eines spezifischen oder auch unspezifischen Malignitätskriteriums im Carcinomextrakt gegenüber dem gleichzeitig mituntersuchten Muttergewebe gegeben werden.

Die Ergebnisse zeigten bereits bei der einfachen Proteinfärbung der getrennten Extrakte gewisse Unterschiedlichkeiten, wobei im Tumorphomogenat vorwiegend anodisch gewanderte Komponenten nachweisbar waren, während die normale Magenschleimhaut ein für sich offenbar organspezifisches Proteinnmuster mit einer auffallend starken, gedoppelten Albuminvorfraction, einem Albumin, im Verhältnis zum Tumorextrakt eine wesentlich geringer konzentrierte α -Globulin und nur schwach gefärbte Fraktion im kathodischen Bereich zeigte. Deutliche Diskrepanzen fanden sich in der Aktivität verschiedener Isoenzyme, so eine deutliche Vermehrung und auch qualitative Abweichung des ^{B/g-}Esterasemusters im Magencarcinomextrakt wie auch der LPH gegenüber dem Normalgewebe sowie eine Verminderung und ebenfalls eine andersartige Verteilung der Glycoproteide und eine Verminderung der alkalischen Phosphataseaktivität. Alle weiteren Untersuchungsergebnisse ließen keine nennenswerten Unterscheidungsmerkmale erkennen. Auf Grund der immunologischen Befunde konnte festgestellt werden, daß die beiden verglichenen Extrakte Proteine enthalten, die untereinander Identität, andere nur teilweise Identität, mindestens 2 aber keine gemeinsamen immunologischen Eigenschaften besitzen. Immunelektrophoretisch konnten diese heterologen Antigene im Absorptionsversuch als α -Globuline identifiziert werden. Die teilweise abweichenden immunologischen Antigeneigenschaften des Carcinomextraktes vom Normalgewebe zeig-

ten sich auch in dem unterschiedlichen Verhalten der sensibilisierten Tiere, die eine quantitativ intensivere und qualitativ unterschiedliche Antikörperbildung der mit Tumorextrakt sensibilisierten Kaninchen gegenüber den mit Normalschleimhautextrakt behandelten Tieren aufwies.

Die Untersuchungsergebnisse wurden im einzelnen dahin diskutiert, ob die im Tumorextrakt nachweisbaren Besonderheiten als Indikatorfaktoren im Rahmen klinisch-serologischer Diagnoseverfahren Bedeutung erlangen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BÄR, U., E. SCHMIDT und F.W. SCHMIDT
Enzymmuster und Isoenzyme menschlicher Tumoren.
Klin. Wschr. 41 , 977 (1963)
2. EDELBACHER, S. und K. NEBER
Herabsetzung der Lipaseaktivität bei Tumoren gegenüber Normalgewebe.
Z. physiol. Chem. 233 , 265 (1935)
3. GÖTZ, H. und F. SCHEIFFARTH
Immunoelktrophoretische Untersuchungen an Organextrakten.
Klin. Wschr. 41 , 587 (1963)
4. GÖTZ, H., G. BERG und F. SCHEIFFARTH
Methodische Grundlagen der Immunoelktrophorese.
Z. Immun. Forsch. 114 , 72 (1957)
5. GÖTZ, H., F. SCHEIFFARTH und I. FÜBELER
Vergleichende elktrophoretische und immunoelktrophoretische Studien
an Organextrakten des menschlichen Magens.
Gastroenterologia 98 , 30 (1962)
6. GÖTZ, H., F. SCHEIFFARTH und G. GAST
Agarelektrophoretische Studien an Leberextrakten.
Z. Gastroenterologie 2 , 148 (1964)
7. GREENSTEIN, P.
Esterases activity of normal and neoplastic tissues of mouse.
J. nat. Cancer Inst. 5 , 31 (1944)

8. GRABAR, P.
Étude sur les protéines à l'aide de méthodes immunochimiques.
Bull. Soc. Chim. biol. 36 , 65 (1954)
9. GRABAR, P. et P. BURTIN
a) Analyse immuno-électrophorétique.
Masson, Paris 1960
b) Immunoelktrophoretische Analyse.
Elsevier, Amsterdam 1964
10. GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS
a) Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin.
Biochim. biophys. Acta 10 , 193 (1953)
b) Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Biochim. biophys. Acta 17 , 67 (1955)
11. LASNITZKI, A.
Neuere Untersuchungen über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.
Z. Krebsforsch. 22 , 531 (1925)
12. MICHEEL, F. und H. DÖRNER
Synthese von Verbindungen des Pektins mit Eiweißstoffen.
(Antigen und Krebs , VII. Mitteilung)
Hoppe-Seyler's Z. physiol Chem. 280 , 92 (1944)
13. MICHEEL, F., H. EMME und H. DÖRNER
Antigene und bösartige Geschwülste. V.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 275 , 258 (1942)

14. OUCHTERLONY, Ö.
Antigen antibody reactions in gels.
Acta path. microbiol. Scand. 26 , 507 (1946)

15. PAULING, L., D.H. CAMPBELL and I. PRESSMANN
The nature of the forces between antigen and antibody and the
precipitation reaction.
Physiol. Rev. 23 , 203 (1943)

16. PFLEITERER, G. und E.F. WACHSMUTH
Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Lactatdehydro-
genase menschlicher Organe.
Biochem. Z. 334 , 185 (1961)

17. RAPP, W., S.B. ARONSON, P. BURTIN and P. GRABAR
Constituents and antigens of normal human gastric mucosa as charac-
terized by electrophoresis and immunoelectrophoresis in agar gel.
J. Immunol. 92 , 579 (1964)

18. RICHTERICH, R.
LDH-Isoenzyme.
Ciba Symposium 12 , 114 (1964)

19. SCHEIFFARTH, F. und H. GÖTZ
Eine Methode zum Diastasenachweis agarelektrophoretisch getrennter
Proteingemische.
Klin. Wschr. 42 , 130 (1964)

20. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und F. CZAGANY
Zur quantitativen Bestimmung der Coeruloplasminkonzentration im Serum.
Med. Welt 28 , 1449 (1961)

21. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und S. EBERT
Über esteraseaktive Fraktionen in verschiedenen menschlichen Organextrakten.
Arbeit im Druck
22. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und D. HOFFMANN
Diastasenachweis in einigen menschlichen Organextrakten mit Hilfe der Elektrophorese im Agargel.
Z. Gastroenterologie 2 , 76 (1964)
23. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und H. MUNSEL
Vergleichende biochemische und immunologische Studien an Proteinextrakten normaler und maligne entarteter Gewebe. (Vergleich der Extrakte eines normalen Leberparenchyms und eines in der Leber primär entstandenen malignen Tumors.)
Arbeit im Druck
24. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ, H. SCHRAMM
Vergleichende Studien an Proteinextrakten normaler und maligne entarteter Gewebe. (Vergleich der Extrakte einer normalen Colonschleimhaut und eines Coloncacinoms.)
Arbeit im Druck
25. SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ und H. GÖTZ
Zum qualitativen und quantitativen Nachweis der alkalischen Phosphatase im Serum mit Hilfe der Agarelektrophorese.
Med. Welt 43 , 2216 (1961)
26. SCHAIPT, H.
Die Reichweite der Spezifität.
Fortschritte der Serologie S. 100 D.Steinkopf-Verlag 1955

27. SCHWICK, G. und K. STÖRIKO

Qualitative und quantitative Plasmaprotein-Bestimmung durch
Immunpräzipitation.

Laborat. Blätter, Behringwerke Mai 1964

28. URIEL, J.

- a) Étude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en gélose.
Bull. Soc. Chim. biol. 105 , Suppl I (1957)
- b) Les réactions de caractérisation des constituants des liquides biologiques après électrophorèse en gélose.
Clin. chim. Acta 3 , 17 (1958)
- c) Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. I. Considérations générales. Application à l'étude constituants protéiques isolés.
Clin. chim. Acta 3 , 234 (1958)
- d) Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. II. Les protéines et les lipoprotéines du sérum humain normal.
Clin. chim. Acta 3 , 384 (1958)

29. URIEL, J. et P. GRABAR

- a) Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié.
Ann. Inst. Pasteur 90 , 429 (1956)
- b) Étude des lipoprotéides sériques par l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-électrophorétique.
Bull. Soc. Chim. biol. 38 , 1253 (1956)

30. URIEL, J. et J.J. SCHEIDEGGER

Électrophorèse en gélose et coloration des constituants.
Bull. Soc. Chim. biol. 37 , 165 (1955)

31. VAN TER HELM, H.J.

A simplified method of demonstrating lactic-dehydrogenase isoenzymes in serum.

Clin. chim. Acta 7, 124 (1962)

An dieser Stelle sei Herrn Prof. Dr. N. Henning für die Übernahme des Referates ergebenst gedankt.

Herrn Prof. Dr. F. Scheiffarth möchte ich danken für die freundliche Überlassung des Themas.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Frau Dr. H. Götz, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, meinen herzlichen Dank auszusprechen.

LEBENS LAUF

Am 15. April 1939 wurde ich, Renate Funke, in Bochum als drittes Kind des Oberstudienrates Dr. Hans Funke und seiner Ehefrau Else, geb. Wortmann, geboren.

Nach der Evakuierung im Mai 1943 zog unsere Familie nach Freren/Krs. Lingen (Ems), in die Heimat meines Vaters. Dort besuchte ich vom Herbst 1945 bis Ostern 1950 die Volksschule, anschließend bis zur Reifeprüfung am 9.2.1959 das staatlich anerkannte, private Mädchengymnasium in Thuine/Krs. Lingen.

Im Sommer Semester 1959 begann ich an der Universität Freiburg das Medizinstudium. Nach dem Vorphysikum im Winter Semester 1960/61 setzte ich das Studium an der Universität Erlangen fort. Dort bestand ich am 1.8.1961 das Physikum. Anschließend studierte ich 2 Semester in Innsbruck, und ein Semester in Würzburg. Im Sommer Semester 1963 kehrte ich an die Universität Erlangen zurück, woselbst ich im Winter Semester 1964/65 das medizinische Staatsexamen bestand.

Seit dem 1. April 1965 bin ich als Medizinalassistentin an der Med. Univ. Klinik beschäftigt.

